

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All			Format	
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	Free

1. ☐ 4/5/1

007959372

WPI Acc No: 1989-224484/198931

XRAM Acc No: C89-099797

Prod. of docosahexaenoyl diacyl glycerol - by extracting
phosphatidyl choline from fish egg, reverse phase column chromatography
and hydrolysis

Patent Assignee: NIPPON OILS & FATS CO LTD (NIOF); RIKAGAKU KENKYUSHO
(RIKA)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 1160988	A	19890623	JP 87318616	A	19871218	198931 B
JP 95062020	B2	19950705	JP 87318616	A	19871218	199531

Priority Applications (No Type Date): JP 87318616 A 19871218

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 1160988	A		9		
JP 95062020	B2		8	C07F-009/10	Based on patent JP 1160988

Abstract (Basic): JP 1160988 A

Phosphatidylcholine obtd. from egg of aquatic animal is subjected to reverse-phase column chromatography and hydrolysed by phospholipase C, to produce docosahexaenoyl diacylglycerol. Docosahexaenic acid is bonded at Sn-2 position.

Egg is pref. that of *Salmo gairdneri*, carp, young yellowtail, or eel. Phosphatidylcholine is extracted from the egg by adding e.g. H₂O and acetone, then homogenising, and extracting with solvent to obtain total lipids. The lipids are subjected to silica gel column chromatography to obtain phosphatidylcholine. Phosphatidylcholine is sep'd. by HPLC using a reverse phase column, then fraction having activity of docosahexaenic acid is treated with phospholipase C. Phosphatidylcholine is hydrolysed to give the desired diacylglycerol. To detect the stereospecificity of the resultant, the resultant is subjected to silica gel TLC, using chloroform/acetone/MeOH (90/9/1, vol/vol/vol) as a developing solvent, monoglyceride as a standard, which are coloured by iodine stream. For analysing docosahexaenic acid, FAB-MS (Pos). can be used.

USE/ADVANTAGE - Diacylglycerol with docosahexaenic acid at Sn-2 position strongly affects differentiating and inducing undifferentiated cell to normal cell. Against cancerous cells, it has anticancer effect. Prod. is obtd. in high yield, and Stereospecificity is maintained.

Title Terms: PRODUCE; DOCOSA; HEXA; DI; ACYL; GLYCEROL; EXTRACT;
PHOSPHATIDYL; CHOLINE; FISH; EGG; REVERSE; PHASE; COLUMN; CHROMATOGRAPHY;
HYDROLYSIS

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C07F-009/10

File Segment: CPI

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-160988

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)6月23日

C 07 F 9/10

A-6917-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 ドコサヘキサエノイルジアシルグリセロールの製造法

⑯ 特 願 昭62-318616

⑰ 出 願 昭62(1987)12月18日

⑱ 発 明 者	日 比 野	英 彦	東京都練馬区旭丘2丁目22番1号
⑱ 発 明 者	福 田	信 雄	茨城県新治郡桜村梅園2-24-5
⑱ 発 明 者	仲 地	理	茨城県牛久市下根町1044-10番地
⑱ 発 明 者	桜 井	成	東京都杉並区南荻窪1丁目33番12号
⑱ 発 明 者	旭	健 一	埼玉県和光市諏訪原団地1-4-108
⑱ 発 明 者	高 橋	信 孝	東京都杉並区荻窪4丁目27番2号
⑰ 出 願 人	日本油脂株式会社		東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
⑰ 出 願 人	理化学研究所		埼玉県和光市広沢2番1号
⑱ 代 理 人	弁理士 舟橋 榮子		

明 細 書

1. 発明の名称

ドコサヘキサエノイルジアシルグリセロール
の製造法

2. 特許請求の範囲

ドコサヘキサエン酸をSn-2位に結合しているSn-1, 2-ジアシルグリセロールの製造にあたり、水産動物の卵を原料としてホスファチジルコリンを分離し、次いで逆相分配カラムクロマト処理した後にホスホリパーゼCで加水分解することを特徴とするドコサヘキサエノイルジアシルグリセロールの製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は癌細胞に対して強い分化誘導活性を示すドコサヘキサエン酸を含有するジアシルグリセロールの製造法に関し、更に詳細にはSn-2位にドコサヘキサエン酸を結合しているSn-1, 2-ジアシルグリセロールを水産動物の卵から分離したホスファチジルコリンから製造する方法に關

する。

(従来技術)

ω -3系高度不飽和脂肪酸の1つであるドコサヘキサエン酸はエイコサペンタエン酸同様、血中のコレステロールやトリグリセリド濃度を低下させ血小板凝集を抑制する作用が知られている。一方、細胞膜を構成する脂質二重層の流動性は、脂質の構成脂肪酸に支配されている。そのため、ドコサヘキサエン酸の様な高度不飽和脂肪酸の取込みは、細胞膜脂質の流動性を変化させ、細胞膜の修飾を経て細胞内に情報を伝達させるために利用されている。

特に細胞のホルモン作用発現機構とリン脂質代謝の関係から細胞膜中のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、およびジアシルグリセロールに存在するドコサヘキサエン酸は細胞膜脂質中に立体規則的に分布していることが知られており、ドコサヘキサエン酸は細胞機能の発現に大きく関与していると思われる。

本発明者らはSn-2位にドコサヘキサエン酸

を有するホスファチジルコリンにフレンド白血病細胞、マウス骨髄性白血病細胞、マウス奇形腫細胞を正常細胞へ分化誘導する作用を先に見出した(特開昭59-46226号)。一方、アール・カンナギら(Biochimica et Biophysica Acta, 712, 161~168, [1982])はネズミ骨髄性白血病細胞の分化誘導前後に細胞膜リン脂質のホスファチジルコリンのドコサヘキサエン酸含量が1/10に減少することを報告している。さらに本発明者らはSn-2位にドコサヘキサエン酸を有するホスファチジルコリンを強力な発生および分化の場となる受精卵に含まれる分化誘導物質として見出した際に、このホスファチジルコリン以外の脂質にも分化誘導活性を認めた。その活性物質はバルミチン酸-ドコサヘキサエン酸およびオレイン酸-ドコサヘキサエン酸のジアシルグリセロールの混合物であった(日本農芸化学会、昭和58年度大会講演要旨集、118頁、2H-2:特開昭60-58917号)。以上の如くドコサヘキサエン酸を含むジアシルグリセロールの生化学的な重要性が発見されるようになった。

n-1位とSn-3位を区別して反応する事は非常に難しく、さらにSn-1, 2-ジアシルグリセロールとSn-2, 3-ジアシルグリセロールの分離が困難である。

グリセロールのSn-2位にドコサヘキサエン酸を結合させた混酸基ジアシルグリセロールの合成を従来法で実施すると、 α -モノクロルヒドリンの一級水酸基にドコサヘキサエン酸以外の脂肪酸クロライドでアシル化し、さらにドコサヘキサエン酸クロライドでSn-2位をアシル化し、硝酸銀処理、希酸処理と複雑な工程を経由することになる。

この従来法では、①脱クロライドで生成する水酸基がSn-2位に転位し、多量のSn-1, 3-ジアシルグリセロールを生成する、②合成物にSn-1, 2-ジアシルグリセロールとSn-2, 3-ジアシルグリセロールが混在すると両者を識別出来ない、③ドコサヘキサエン酸のクロライド化の際、二重結合のマイグレーションが生じ易い等の欠点を有している。

たが、これらの製造に関してはこれまで開発されていないのが現状である。

(発明が解決しようとする問題点)

ドコサヘキサエン酸は水産動物の脂肪組織中ではトリアシルグリセロールとして存在し、動物の生体組織中では細胞膜構成成分の極性脂質中に見出される。特に動物においてドコサヘキサエン酸に富む部位は脳の髄鞘、視神経の桿体および肝臓等が知られているが、主としてリン脂質に局在している。また比較的入手が容易な血球や卵黄のリン脂質や、水産動物のリン脂質にもドコサヘキサエン酸は豊富である。

グリセロールのSn-1位とSn-2位に特定脂肪酸を組み込んでSn-1, 2-ジアシルグリセロールを合成する方法は既に知られている。これらの合成法では合成過程においてSn-1, 2-ジアシルグリセロールが非常に高い比率でSn-1, 3-ジアシルグリセロールにマイグレーション(転移)する。そのためSn-1, 2位に異なる脂肪酸を組み込む事は難しい。化学合成法ではS

そのため得られるジアシルグリセロールは細胞レベルの実験で、厳しい立体構造の識別を行う酵素やレセプターに対して正確に認識されない。例えばビー・ジェー・ホルブらは血小板に対してその酵素反応系を活性化するジアシルグリセロールは、イノシトールリン脂質の加水分解物と同一の立体構造を示すSn-2位に高度不飽和脂肪酸を有するSn-1, 2-型ジアシルグリセロールであることを証明している(J. Lipid Res. 11, 558~564, 1981)。

上述のように現在まで、Sn-2位にドコサヘキサエン酸を有するジアシルグリセロールを天然原料から直接分取したり、化学合成のみで製造する事は非常に困難であった。

従って、本発明の目的は、経済的、且つ高収率にて、出来るだけ簡単な工程によりSn-2位にドコサヘキサエン酸を有するジアシルグリセロールを製造することにある。

(問題点を解決するための手段)

本発明は、水産動物の卵を原料としてホスファ

チジルコリンを分離し、次いで逆相分配カラムクロマト処理した後にホスホリパーゼCで加水分解することの特徴とする。本発明方法を行うことにより S_n-1 位に飽和酸又はモノエン酸を結合し、 S_n-2 位にドコサヘキサエン酸を結合した $S_n-1, 2$ -ジアシルグリセロールが容易に得られる。

以下本発明につき更に詳細に説明する。

本発明者らは、先に低毒性で制癌性を有する物質を動物、植物、微生物界の広い生物範囲から探索し、その結果、強力な発生および分化の場となる受精卵について、水産動物の一種であるニジマス (*Salmo gairdneri*) の胚を用いて、この胚中の総脂質中に活性があることを示した(旭健一: 癌細胞の分化誘導と制癌(穂積本男、高久史郎編)、261~278頁、ソフトサイエンス社、東京、1985)。これらの物質は未分化培養癌細胞に対する分化誘導能を指標として検索された。このバイオアッセイで見出されたコリン含有リン脂質は、動物の腫瘍細胞に対して分化誘導活性を有する他に、著しく低毒性で優れた制癌活性を持っていた。コリン

含有リン脂質にはスフィンゴリン脂質とグリセロリン脂質の二つの大群が知られているが、前者に属するスフィンゴミエリンのアミド結合が見出されないことから後者に属することが推定された。後者にはモノアシルモノエーテル型、ジアシルエステル型、モノアシル-1-モノアルケニルエーテル(プラズマロゲン)型、モノアシル(リゾ)型が存在するが、質量分析より求めた分子量M、ホスホリパーゼA₁(S_n-1 位のエステル結合を特異的に加水分解する)、ホスホリパーゼA₂(S_n-2 位のエステル結合を特異的に加水分解する)の加水分解によって脂肪酸が別々に得られることからジアシルエステル型のグリセロリン脂質、即ちホスファチジルコリンと判断した。

さらに単離されたホスファチジルコリンを逆相分配カラムを装着した高速液体クロマトグラフィーで各分子種ごとに分画して、個々の分画をバイオアッセイで検討したところ特定の分子種の方に分化誘導活性が認められた。活性が認められた分子種は高速液体クロマトグラフィーで求められた

クロマトグラム上の大部分を占めるメインピークであった。メインピークから回収されたホスファチジルコリンの分子種を決定するため、このホスファチジルコリンを三弗化ホウ素メタノール法で脂肪酸をメチルエステル化した。脂肪酸メチルの同定はキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー(液相: カーボワックス20M、25m)における標準体との保持時間の同一性で行った。

その結果、 $C_{22:1} \omega 3$ (即ちドコサヘキサエン酸)が主成分で、その他に $C_{18:1}$ (パルミチン酸)、 $C_{18:0}$ (ステアリン酸)、 $C_{16:1}$ (オクタデセン酸)が同定された。同定された脂肪酸のホスファチジルコリンの S_n 位置を決定するため前述のホスホリパーゼで測定した。メインピークから回収されたホスファチジルコリンをホスホリパーゼA₁により加水分解し、三弗化ホウ素メタノール法で脂肪酸をメチルエステル化した。ガスクロマトグラフィーで分析した結果、 $C_{18:0}$ と $C_{16:1}$ が主成分でその他に $C_{18:1}$ が同定された。次に、このホスファチジルコリンをホスホリパー

ゼA₂により加水分解し、三弗化ホウ素メタノール法で脂肪酸をメチルエステル化した。ガスクロマトグラフィーで分析した結果、ドコサヘキサエン酸がメイン成分として同定された。このホスファチジルコリンの推定される分子種を分析するため質量分析計FAB-MS(Pos.)への直接導入法による分子イオンに相当する質量スペクトル m/z を測定した。その結果、 m/z 806($C_{18:0}$ -ドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンに相当)、 m/z 832($C_{16:1}$ -ドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンに相当)、 m/z 834($C_{18:0}$ -ドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンに相当)に高い強度を示した。

このホスファチジルコリンは水産動物の卵から下記の様に高収率で得られる。卵中の総脂質は約1割でその半分はリン脂質である。詳細には、総脂質に対するホスファチジルコリン量は30%でリン脂質に対してホスファチジルコリン量は70%である。しかも、分化誘導活性を示す S_n-2 位にドコサヘキサエン酸を結合するホスファチジルコ

リンは卵ホスファチジルコリンの主成分である。また、ドコサヘキサエン酸含有ホスファチジルコリンは逆相分配クロマトグラフィーにおいては最初に溶離する成分であり、使用する溶離液もメタノール単独で十分である点から分取しやすい材料である。

水産動物の卵から得られる総脂質中のホスファチジルコリンは上述したように30%以上もあり、さらに活性を示す分子種はクロマトグラム上のメインピークである点から、活性を示す分子種のジアシルグリセロールを分取する原料に適している。

また、ドコサヘキサエン酸は、植物性原料からは見出し難く、動物性原料でも陸上動物よりも水産動物から見出されるので、これらの動物の卵が原料として好ましい。天然原料にはシャケやニシン等の水産動物の卵が入手容易であり、また、養殖が盛んなハマチ、コイ、ウナギ、ニジマス、クルマエビ等の卵も原料として好ましい。

これらの原料は、可能な限り新鮮であることが望ましく、採卵後直ちに冷凍、凍結乾燥または真

空乾燥処理した原料を使用すると、原料中の酸価の上昇、得られる目的物の過酸化物質の上昇による品質低下を避けることができ、良質な目的物を得ることができる。

従って、本発明では、まず、水産動物の卵を原料としてホスファチジルコリンを分離する。ホスファチジルコリンの分離は、常法により例えば溶剤抽出後に行うことができる。その際、材料に対して例えば蒸留水およびメタノール・クロロホルム系溶媒、アセトン、エーテル、ヘキサン等の溶剤を加え、必要に応じて、その混合物をロウルデス・ホモジナイザー、ソルバール・オムニミキサー、ワーリングブレンダー、ポッター・エルベージェム・ガラスホモミキサー等によってホモジナイズする。無酸素状態下として、例えば真空下、窒素気流下および二酸化炭素気流下に、0℃～60℃、10～180分溶剤抽出することができる。溶剤は魚卵1部に対して1～5部添加するのが普通である。

溶剤抽出した総脂質からホスファチジルコリン

を分離する方法としては、例えば次のような方法がある。総脂質を冷アセトン処理してリン脂質を分画してからカラムクロマト法で分離する方法、総脂質を直接シリカゲルクロマトグラフィーに付し、ヘキサノール・クロロホルム・メタノールと溶媒の混合比率を無極性溶媒から極性へ変化させながら分離する方法等である。

次に、総脂質中のホスファチジルコリンより逆相分配カラム、例えば高速液体クロマトグラフィー、好ましくは全自動分取型高性能液体クロマトグラフィーによって分取し、次いで活性を示す分子種のホスファチジルコリンを、ホスホリパーゼCで処理する。ホスファチジルコリンをホスホリパーゼCで処理すると目的のジアシルグリセロールとコリンホスフェートに加水分解される。

本発明に用いることができるホスホリパーゼCは、一種のホスホジエステラーゼで、グリセロリン脂質やスフィンゴミエリンのリン酸ジエステル結合を加水分解し、ジアシルグリセロールやセラミドとリン酸モノエステルを生成する一群の酵素

の総称である。ホスホリパーゼCは、クロストリジウム属の細菌やバチルス・セレウス等の培養濾液から得られるものを用いることができる。反応生成物は、エチルエーテル等の溶媒で抽出して分析することができる。

反応生成物のジアシルグリセロールの立体特異性を測定するには、例えばシリカゲル薄層クロマトグラフィーに付し、クロロホルム/アセトン/メタノール(90/9/1, vol/vol/vol)を展開溶媒とし、未蒸留モノグリセリドを標準物質として展開し、ヨウ素蒸気で発色させる。その結果、この反応生成物はSn-1位、2位ジアシルグリセロールであると同定される。また、この反応生成物の推定される分子種を分析するには、例えばPAB-M S(Pos.)への直接導入法により分子イオンに相当するm/zを測定する。その結果m/z 663(M+Na; C_{44:0}-ドコサヘキサエン酸・ジアシルグリセロールに相当)、m/z 689(M+Na; C_{46:0}-ドコサヘキサエン酸・ジアシルグリセロールに相当)、m/z 671(M+Na; C_{44:0}-ドコ

サヘキサエン酸・ジアシルグリセロールに相当)に高い強度が見られる。

このホスファチジルコリンから得られたジアシルグリセロールは原料ホスファチジルコリンのホスホリバーゼA₂の加水分解によりS_n-2位にドコサヘキサエン酸が結合していたことは証明されている。即ち、この反応生成物はドコサヘキサエン酸をS_n-2位に結合しているS_n-1位、2位ジアシルグリセロールである。このジアシルグリセロールは総脂質中のジアシルグリセロールから分取された活性を示す分子種群のジアシルグリセロールと同等の分化誘導活性を示す。

(発明の効果)

本発明の方法によれば、水産動物の卵を原料として精製処理することにより、植物細胞、受精卵および癌細胞、例えば奇形腫細胞、白血病細胞等の如き未分化細胞を正常細胞に分化誘導する作用(腫瘍細胞や癌細胞に対しては制癌作用)を有するドコサヘキサエン酸をS_n-2位に結合しているジアシルグリセロールを、簡単な方法で、しか

も天然の立体特異性を維持したまま、高収率で得ることが出来る。

(実施例)

以下、本発明を実施例および試験例によって更に詳細に説明する。

実施例1

採卵後直ちに冷凍したニジマスの受精卵を窒素気流下で解凍した。この原料1300gをアセトン2ℓに入れ、窒素気流下、T.H.ホモミキサー(特殊機工業製)で荒くホモゲナイズしてからエクセル・オート・ホモゲナイザー(日本精器製作所製)で氷冷状態で30分ホモゲナイズした。

懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からアセトン抽出物10gを得た。乳灰色の湿ケーキ830gをエチルエーテル3ℓに入れ、スリーワンモータータイプ600GM(新東科学製)で200rpmで回転しながら30分間抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からエチルエーテル抽出物48gを得た。乳灰色の湿ケーキ770gをクロロホル

ム-メタノール(1/1, vol/vol)混液1ℓで2回、分液漏斗中で抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と乳灰色の湿ケーキに分けた。濾液からクロロホルム-メタノール抽出物55gを得た。乳灰色の湿ケーキ690gにクロロホルム-メタノール(2/1, vol/vol)混液1.5ℓで2回、分液漏斗中で抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からクロロホルム-メタノール抽出物を5g得た。各脂質抽出物を一緒にした。総脂質量118gであった(対原料収率9.1%)。

総脂質の全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカ60、和光純薬製:8φ×40cmカラムに2ℓ)に付した後、ヘキサン中にクロロホルムの比率を上げていく溶離液系で中性脂質を除去した。中性脂質の回収量69gで、組成は薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:ヘキサン-エチルエーテル-酢酸50/50/1, vol/vol/vol)分析でトリアシルグリセロールが主体であった。

中性脂質を除いたカラムに、クロロホルム中に

メタノールの比率を上げていく溶離液系を流した。クロロホルム対メタノールの比率が35:65~25:75の範囲にホスファチジルコリンを主成分とする区分が溶出し、脱溶媒後、28gのホスファチジルコリンを得た。ホスファチジルコリン区分の判定は、薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム-メタノール-水65/25/4, vol/vol/vol)で行った。この分画の内、薄層クロマトグラフィーでR_f値0.20~0.30(ホスファチジルコリン)にシングルスポットのみが認められる分画を集めて、窒素気流下で脱溶媒を行い、純ホスファチジルコリンを16.7g得た。

次いで、得られたホスファチジルコリンを167mlのベンゼンに溶解してクロマトグラフィー用サンプル溶液とした。サンプル溶液は、全自動分取型液体クロマトグラフィー(東洋曹達工業製、HLC-837)にODS(オクタデシルシリル基を化学結合させたシリカゲル)充填カラム(ODS-120 T、φ55mm×60cm)を装着し、溶離液としてメタノールを40ml/minの速度で流しながら、6

mlを自動注入し、目的物のメインピーク部を連続28回分取した。分取区分を窒素気流下で脱溶媒して目的物のホスファチジルコリンを12.2g得た。

分取されたホスファチジルコリンを三弗化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャピラリーカラムガスクロマトグラフィー（液相：カーボワックス-20M、25m、170℃）で脂肪酸組成を測定した。その結果、ドコサヘキサエン酸は41%で、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸が各約10%を占めていた。

このホスファチジルコリンをホスホリパーゼA₂で加水分解し、三弗化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーでS_n-2位の脂肪酸組成を測定した。その結果、ドコサヘキサエン酸は82%であり、その他に数本の微小ピークが認められた。

また、ホスファチジルコリンの過酸化脂質量は、電位差滴定法（自動滴定装置GT-05、三菱化成工業製）で測定した結果、27.5meq./kgであった。

クロロホルム、ヘキサンに可溶で水に不溶であった。

薄層クロマトグラフィーのクロロホルム/メタノール/水系（65/25/4, vol/vol/vol）展開溶媒で反応前後の成分を測定した。

反応後の成分のR_F値は、反応前の0.3から0.8に変化し、ドラージェンドルフ試薬とデिटマー・レクター試薬に対する発色が陽性から陰性に変化した。クロロホルム/アセトン/メタノール系（90/9/1, vol/vol/vol）展開溶媒で標準体として未蒸留モノグリセリドと共に反応後の成分を測定した。

反応後の成分はR_F値が0.65で、標準体のS_n-1位、2位ジアシルグリセロールの位置に相当していた。本成分はFAB-MSによって、分子量640（(M+Na)⁺663）、分子量666（(M+Na)⁺689）および分子量668（(M+Na)⁺691）が認められた（第1図）。

実施例2

採卵後直ちに冷凍したニジマスの受精卵を窒素

分取されたホスファチジルコリンの一部500mgを600μlのメタノールに溶解し、ホスホリパーゼC（シグマ社製、No. B C 3.1.4.3；バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）起源）を300unit、0.2Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.4）を5ml、0.05M塩化カルシウムを3ml、エチルエーテルを3ml加えた。反応混合物をスクリュウキャップ付20mlの試験管中にテフロンスターラーバーと共に加えて、35℃で1時間激しく攪拌しながらインキュベーションした。

反応混合物にエチルエーテル10mlを加えてから分液漏斗に移し、抽出後、窒素気流下で濃縮した。エチルエーテルで抽出された反応混合物中の未反応のホスファチジルコリンを除去するため、アセトンを1ml加え、ホスファチジルコリンを沈澱させた。エチルエーテル層を硫酸ナトリウムで脱水し、さらに、窒素気流下で脱溶媒して目的のコリン基が切除されたジアシルグリセロールが420mg得られた。

得られたジアシルグリセロールは油状であり、

気流下で解凍した。この原料1500gをクロロホルム/メタノール（2/1, vol/vol）混液6ℓに入れ、窒素気流下、T.H.ホモミキサー（特殊機工業製）で高速で剪断抽出しながら氷冷状態で30分間ホモゲナイズした。

懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と乳灰色の湿ケーキに分けた。乳灰色の湿ケーキ910gを上記溶媒2ℓに入れ、上記と同一の条件で処理した。同様に懸濁液から濾液と湿ケーキに分けた。乳灰色の湿ケーキ780gを上記溶媒2ℓに入れ同一条件で処理した。さらに3回目の懸濁液から濾液と湿ケーキの濾別を行った。全濾液を集めて遠心分離し、上澄液にクロロホルム3ℓと蒸留水3ℓを加えて、よく水洗した後、遠心分離で二層に分離した。

下層のクロロホルム層を集めて、窒素気流下、ロータリーエバポレーターを用い、30℃で濃縮し、溶媒留去の最後にベンゼン100mlを加えて脱水を行いながら脱溶媒した。溶媒を留去した抽出物を真空デシケーターで一昼夜乾燥して得られた全脂

質の重量は、127g(対原料収率 8.5%)であった。

得られた全脂質を氷冷アセトン1.3 ℓ 中に入れ、窒素気流下、スリーワンモータータイプ600 GM(新東科学製)で200rpmで回転しながら10分間抽出した。アセトン懸濁液を冷却したブッフナー漏斗で濾過し、沈澱を回収した。この沈澱に、上記同様の冷アセトン処理を4回繰り返して、完全に中性脂質を除いたリン脂質分画57g(総脂質中45.2%)を得た。リン脂質全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(富士ゲルC G-3、水戸化学製、5φ×40cmカラムに700cc)に付した後、クロロホルム-メタノール(4/1, vol/vol)混液の溶離液系でホスファチジルコリン以前に溶出するホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質を除去した。

さらに純粋なホスファチジルコリンを分画するためクロロホルム-メタノール(3/2, vol/vol)混液の溶離液系で溶出させた。溶離液500 mlずつ分画し、各分画を薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム-メタノール-水 65/25/

4, vol/vol/vol)で測定した。薄層クロマトグラフィー上のRf値0.20~0.30(ホスファチジルコリン)にシングルスポットのみが認められる分画を集めて、窒素気流下で脱溶媒を行い、純ホスファチジルコリンを19g得た。

次いで、得られたホスファチジルコリンを190 mlのベンゼンに溶解してクロマトグラフィー用サンプル溶液とした。サンプル溶液は、全自動分取型液体クロマトグラフィー(東洋曹達工業製、HLC-837)にODS充填カラム(ODS-120T、φ55mm×60cm)を装着し、溶離液としてメタノールを40 ml/minの速度で流しながら、6 mlを自動注入し、目的物のメインピーク部を連続32回分取した。分取区分を窒素気流下で脱溶媒して目的物のホスファチジルコリンを13.9g得た。

このホスファチジルコリンを実施例1と同様に分析したところ、脂肪酸組成としてドコサヘキサエン酸を40%含有しており、またホスホリパーゼA₂で加水分解して得たSn-2位の脂肪酸組成は、ドコサヘキサエン酸を83%含有していた。ま

た、過酸化脂質量は、23.8meq./kgであった。

分取されたホスファチジルコリンの一部700 mgを800 mlのメタノールに溶解し、ホスホリパーゼC(シグマ社製、No. EC 3.1.4.3; クロスト記リジウム・ペルフリンゲンス(*Clostridium perfringens*)起源)を400unit、0.2Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)を6 ml、0.05M塩化カルシウムを3.5 ml、エチルエーテルを4 ml加えた。反応混合物をスクリーキャップ付20mlの試験管中にテフロンスターラーバーと共に加えて、35℃で1時間激しく攪拌しながらインキュベーションした。

反応混合物にエチルエーテル12 mlを加えてから分液漏斗に移し、抽出後、窒素気流下で濃縮した。エチルエーテルで抽出された反応混合物中の未反応のホスファチジルコリンを除去するため、氷冷アセトンを1 ml加え、ホスファチジルコリンを沈澱させた。エチルエーテル層を硫酸ナトリウムで脱水し、さらに、窒素気流下で脱溶媒して目的のジアシルグリセロールが598mg得られた。

得られたジアシルグリセロールは油状であり、

クロロホルム、ヘキサンの可溶で水に不溶であった。

薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム/メタノール/水系(65/25/4, vol/vol/vol))で反応前後の成分を測定した。

反応後の成分のRf値は、反応前の0.3から0.8に変化し、ドラーゲンドルフ試薬とデイトマー・レスター試薬に対する発色が陽性から陰性に変化した。さらに、薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム/アセトン/メタノール系(90/9/1, vol/vol/vol))で標準体として未蒸留モノグリセリドと共に反応後の成分を測定した。

反応後の成分はRf値が0.65で、標準体のSn-1位、2位ジアシルグリセロール(一般名β-ジアシルグリセロール)の位置に相当していた。本成分は、FAB-MSによって分子量640((M+N)⁺663)、分子量666((M+N)⁺689)および分子量668((M+N)⁺691)が認められた。

実施例3

タラの卵500gを実施例1と同様に溶剤処理して、

脂質14g(対原料収率 2.8%)を得た。この脂質の全量を実施例1と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して同様に処理し、薄層クロマトグラフィーでRf値0.20~0.35のシングルスポットを示す純ホスファチジルコリン分画4.8gを得た。

次いで、この純ホスファチジルコリンを実施例1と同様に全自動大量分取液体クロマトグラフィーに付して、連続14回自動分取を繰り返し、メインピークを分取して、目的のホスファチジルコリン3.3gを得た。

このホスファチジルコリンを実施例1と同様に分析したところ、脂肪酸組成としてドコサヘキサエン酸を40%含有しており、また、ホスホリパーゼA₂で加水分解して得たSn-2位の脂肪酸組成は、ドコサヘキサエン酸を82%含有していた。また、過酸化脂質量は15.6meq./kgであった。

次いで、分取されたホスファチジルコリンの一部500mgを、実施例1と同じホスホリパーゼCを用いて同様に処理し、コリン基が切断された目的

のジアシルグリセロール370mgを得た。このジアシルグリセロールは、実施例1と同じ試験をした結果、同様の性状と特性値を示したので、Sn-2位にドコサヘキサエン酸を含有するドコサヘキサエニルジアシルグリセロールであると認められた。

実施例4

ニシンの卵500gを実施例1と同様に溶剤処理して、脂質13.5g(対原料収率 2.7%)を得た。この脂質の全量を実施例2と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して同様に処理し、薄層クロマトグラフィーでRf値0.20~0.35のシングルスポットを示す純ホスファチジルコリン分画5.3gを得た。

次いで、この純ホスファチジルコリンを実施例1と同様に全自動大量分取液体クロマトグラフィーに付して、連続11回自動分取を繰り返し、メインピークを分取して、目的のホスファチジルコリン3.9gを得た。

このホスファチジルコリンを実施例1と同様に

分析したところ、脂肪酸組成としてドコサヘキサエン酸を42%含有しており、また、ホスホリパーゼA₂で加水分解して得たSn-2位の脂肪酸組成は、ドコサヘキサエン酸を85%含有していた。また、過酸化脂質量は9.8meq./kgであった。

次いで、分取されたホスファチジルコリンの一部700mgを、実施例2と同じホスホリパーゼCを用いて同様に処理し、コリン基が切断された目的のジアシルグリセロール512mgを得た。このジアシルグリセロールは、実施例1と同じ試験をした結果、同様の性状と特性値を示したので、Sn-2位にドコサヘキサエン酸を含有するドコサヘキサエニルジアシルグリセロールであると認められた。

試験例

実施例で得られた化合物を用いて、フレンド白血病細胞(マウス赤芽球性白血病細胞、B8細胞)に対する制癌活性を確認した。HAMのF-12培地(GIBCO製)に、15%の牛胎児血清および60mg/lのカナマイシンを加えたものに、 25×10^4

cell/mlとなるようにB8細胞を接種し、これに各実施例で得られた化合物を250μg加えた。この際、最終容量は5mlであった。

8.0%炭酸ガス中、37℃で7日間培養した後、オルキンのベンチジン染色法により染色し、染色された細胞数、即ち、赤血球への分化によりヘモグロビンを産生するようになった細胞数を測定し、全細胞数に対する染色された細胞数の百分率から、分化誘導率(%)を求めた。実施例で得られた化合物は、両者とも50μg/mlの濃度で80%の分化誘導率があった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の実施例1で得られたジアシルグリセロールの質量分析計FAB-MS(Pos.)による質量スペクトルである。

特許出願人 日本油脂株式会社
理化学研究所
代理人 弁理士 舟橋 榮子

第 1 図

